

癌に対するバイオセンサー型DNAチップの開発

著者	金子 周一
著者別表示	Kaneko Shuichi
雑誌名	平成13(2001)年度 科学研究費補助金 地域連携推進 研究費 研究成果報告書
巻	1999-2001
ページ	10p.
発行年	2002-03
URL	http://doi.org/10.24517/00049430

癌に対するバイオセンサー型DNAチップの開発

研究課題番号：11794017

平成11年度～13年度科学研究費補助金（地域連携推進研究（1））
研究成果報告書

平成14年3月

研究代表者 金子周一

（金沢大学大学院医学系研究科）

著 者 寄贈

目 次

はしがき	1
研究組織	3
交付決定額	3
研究発表 (1) 学会誌等	4
研究発表 (1) 口頭発表	5
研究発表 (3) 出版物	6
研究成果による工業所有権の出願・取得状況	7
Serum level of soluble interferon alpha/beta receptor as an inhibitory factor of IFN in the patients with chronic hepatitis C	8
Quasispecies of hepatitis C virus in serum and in three different parts of the liver of patients with chronic hepatitis	15
Inhibition of peripheral blood lymphocyte apoptosis by soluble Fas ligand in patients with hepatocellular carcinoma	21
Up-regulation of Type I interferon receptor by interferon-gamma	28
Investigation of albumin-synthesizing ability in rat cirrhotic liver-directed hepatocytes using primary hepatocyte culture	33
Human hepatitis B virus X protein augments the DNA binding of NF-IL6 through its basic-leucine zipper domain	40
Intratumoral genomic heterogeneity in human hepatocellular carcinoma detected by restriction landmark genomic scanning	48

Comprehensive gene expression profile of a normal human liver	55
Cell cycle regulation of hepatitis C virus IRES-directed translation	62
Interferon-alpha modulates resistance to cisplatin in three human hepatoma cell lines	73
Serial Analysis of Gene Expression in Chronic Hepatitis C and Hepatocellular Carcinoma	81
Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma with cDNA microarrays	89
Differential Gene Expression Between Chronic Hepatitis B and C Hepatic Lesion	98
Alpha-fetoprotein-producing hepatoma cell lines share common expression profiles of genes in various categories demonstrated by cDNA microarray analysis	110
Electrochemical Gene Detection Using Microelectrode Array on a DNA Chip	126
Electrochemical Gene Detection Using Microelectrode Array and PCR	130
バイオセンサーチップ	137
Electrochemical Gene Detection with PCR Chip	146

は し が き

1. 研究の背景

多数の遺伝子が関与することによって各種の病態が形成されていると考えられるが、従来の手法では多数の遺伝子変化を統合的に解析することが困難であった。しかし現在ではわずかな臨床材料から遺伝子全体の変化を統合的に解析することが可能となっている。こうした手法に DNA チップがある。DNA チップは診断だけでなく治療薬剤の選択といった利用、さらには疾病の予後の決定にも導入されていくことが予想されており、大きな市場が期待されている。このため本研究を開始した平成 11 年度には、欧米ではすでに多くの企業が DNA チップの開発に着手していた。

この開発に必要なものは各種疾病における病態毎の遺伝子情報であり、もうひとつは DNA チップを開発・生産する技術である。我々はこれまで肝癌を中心に統合的な遺伝子発現の解析を行ってきており、その遺伝情報は蓄積されている。北陸先端大の民谷は、DNA チップのバイオセンサーに関する指導者の一人であり、石川県の渋谷工業（株）と共同で、これまでもバイオセンサーの生産を行ってきた。富山県の北斗化学（株）は DNA チップ作製機の開発を行っている。東洋紡（株）はバイオテクノロジー関連の試薬に関する最大手のひとつであるが、福井県に研究所を有し、数万におよぶ遺伝子の供給と遺伝子情報の管理を検討していた。本研究はこうした北陸 3 県のバイオテクノロジーに従事する施設の共同となった。このように本研究には大きな発展が望まれ、さらには地域発展基盤の整備につながる背景を有していた。

2. 研究の目的

初年度は 1) 肝癌に関連する肝臓内の遺伝子の発現のパターンを明らかにすると同時に、その情報を用いて 1,000 個程度の遺伝子の選択を行い、DNA チップを作製すること、2) このチップの情報を微少電極集積型バイオセンサーにて読みとる技術を開発することを目的とした。2 年目以降はチップの開発をさらにすすめ臨床応用をめざすことを目的とし、これによって北陸 3 県のバイオテクノロジー技術をさらに発展させていくことを目指した。

3. 研究の成果

- 1) 正常肝、肝細胞癌および高癌化状態にあると考えられる慢性肝炎・肝硬変組織を用いて、選択した約 1000 個の遺伝子をのせた DNA チップにおける解析を行った。100 例におよぶ臨床材料の解析から、各病態における発現遺伝子のプロファイルが得られた。DNA チップ解析による発現遺伝子の解析によって、従来の生化学所見や病理組織では得られなかった情報が得られ、DNA チップが新たな診断法のひとつになりうる可能性を示すことが出来た (Gastroenterology 2001)。また肝癌由来培養細胞および肝癌を用いて、DNA チップを用いた新たな腫瘍マーカーの可能性、および分化度を推定する診断法になる可能性を示した (Hepatology 2001a, 2001b)。一連の成果は国際的にも肝臓病学をリードするものであり、米国専門雑誌の表紙にも取りあげられた。
- 2) 慢性肝炎から肝硬変、さらには肝癌にいたる遺伝子群を同定するために、serial gene expression analysis (SAGE) 法を行い、世界に先駆けて肝臓病において発現している包括的な遺伝子発現のプロファイルを作製した (BBRC 2000, 2001)。さらに解析をすすめ、現在では 30 万発現遺伝子を解析し、世界最大の肝臓発現遺伝子データベースを有することが出来た。
- 3) 一連の成果から、インターフェロンに対する C 型慢性肝炎の薬剤反応性を事前に DNA チップで検査する方法を開発し、(株) JGS から臨床検査試薬として DNA チップが平成 14 年に発売され、すでに多くの臨床医が使用するにいたった。
- 4) 微小電極を用いて検出するためのインターカレーターの選定および、反応条件を設定した。従来の核酸固定型の微小電極の研究に加え、液層における反応系を考案し、液層における反応から電位が得られ、目的とする核酸の測定を可能とした。これらの技術を特許出願した (平成 13 年)。
- 5) 微小電極測定に導入するための微量のサンプルを増幅する、小型のサーマルサイクラーを開発し、特許出願した (平成 12 年)。
- 6) 従来の DNA チップ作製装置を改良し、基盤上の微小な金属電極に DNA をスポットする装置を開発した (特許出願準備中)。
- 7) これらの研究をもとに微小電極を用いた核酸測定系を開発した (特許出願準備中)。この測定系では核酸を電極に固定せず、液層にて電位を測定するものであり、測定用のチューブを考案している。また測定機器は、これまでの DNA チップ測定のレーザー機器のような大型の機器と異なり、電位を測定するものであるため小型であり、安価で迅速に試料を測定できるメリットをもつことから、臨床の現場で使用できるものと

なっている。

4. 考案

研究目的であった肝臓における遺伝子発現の包括的解析研究においては、明らかに世界をリードする内容の研究が行われた。本研究から、我々は現在では世界最大の肝臓発現遺伝子のデータベースを有しており、これらの情報をもとに、今後新たな診断薬開発が行われるものと期待される。

微小電極を用いたバイオセンサーの研究としては、集積化にいたっていないものの、まったく新規の測定系を開発することが出来た。本研究をもとに、共同研究の企業だけでなく、新たに3社の会社が参画して新規の研究開発が進んでおり、商品として市場に出たもの、あるいは商品化にむけて準備中のものがある。とりわけ微小電極を用いた DNA チップは、大きな市場が期待される。

問題点としては、遺伝子を供給する予定であった企業や、バイオセンサーを加工する予定であった企業にとって、新規の研究開発が容易でなかったことがあげられる。しかしこれらの企業とも、地域の連携という観点から親密な関係を構築することが出来たことが有意義であった。

研 究 組 織

研究代表者：金子周一（金沢大学大学院医学系研究科）

研究分担者：本多政夫（金沢大学大学院医学系研究科）

研究分担者：中本安成（金沢大学医学部附属病院）

研究分担者：民谷栄一（北陸先端科学技術大学院大学材料科学研究所）

研究分担者：川上文清（東洋紡績（株）敦賀バイオ研究所）

研究分担者：佐々木基（澁谷工業（株）メカトロ事業部）

研究分担者：荒川久雄（北斗科学産業技術開発部）

交 付 決 定 額（配 分 額）

（金額単価：千円）

	直 接 経 費	間 接 経 費	合 計
平成 11 年度	23,500	0	23,500
平成 12 年度	18,000	0	18,000
平成 13 年度	15,000	0	15,000
総 計	56,500	0	56,500

研 究 発 表

(1)学会誌等

1. Eishiro Mizukoshi, Shuichi Kaneko, Kyosuke Kaji, Shuichi Terasaki, Eiki Matsushita, Masahiro Muraguchi, Yasukazu Ohtomo, and Kenichi Kobayashi Serum level of soluble interferon alpha/beta receptor as an inhibitory factor of IFN in the patients with chronic hepatitis C Hepatology 30、1325-1331、1999
2. Akito Sakai, Shuichi Kaneko, Masao Honda, Eiki Matsushita, and Kenichi Kobayashi Quasispecies of hepatitis C virus in serum and in three different parts of the liver of patients with chronic hepatitis Hepatology 30: 556-561, 1999
3. Yasunari Nakamoto, Shuichi Kaneko, Stephan W. Buttner, Eiki Matsushita, and Kenichi Kobayashi Inhibition of peripheral blood lymphocyte apoptosis by soluble Fas ligand in patients with hepatocellular carcinoma Oncology Report 6: 733-739, 1999
4. Eishiro Mizukoshi, Shuichi Kaneko, Masayuki Yanagi, Hideki Ohono, Eiki Matsushita, and Kenichi Kobayashi Up-regulation of Type I interferon receptor by interferon-gamma Journal of Interferon and Cytokine Research 19: 1019-1023, 1999
5. Takayoshi Koura, Shuichi Kaneko, Eiki Matsushita, Hideki Ohno, Kyousuke Kaji, Kenichi Kobayashi Investigation of albumin-synthesizing ability in rat cirrhotic liver-directed hepatocytes using primary hepatocyte culture Journal of Hepatology 31: 293-299, 1999
6. Hideki Ohono, Shuichi Kaneko, Kenichi Kobayashi, Seishi Murakami Human hepatitis B virus X protein augments the DNA binding of NF-IL6 through its basic-leucine zipper domain Journal of Medical Virology 58: 11-18, 1999
7. Rieko Saeki, Hisaki Nagai, Shuichi Kaneko, Masashi Unoura, Naoki Yamanaka, Eizo Okamoto, Kenichi Kobayashi, and Kenich Matsubara Intratumoral genomic heterogeneity in human hepatocellular carcinoma detected by restriction landmark genomic scanning Journal of Hepatology 33: 99-105, 2000
8. Taro Yamashita, Shinichi Hashimoto, Shuichi Kaneko, Shigenori Nagai, Nobuaki Toyoda, Takuji Suzuki, Kenichi Kobayashi, and Kouji Matsushima. Comprehensive gene expression profile of a normal human liver. Biochemical and Biophysical Research Communications 269: 110-116, 2000
9. Masao Honda, Shuichi Kaneko, Eiki Matsushita, Kenichi Kobayashi, Abel GA, Lemon SM. Cell cycle regulation of hepatitis C virus IRES-directed translation. Gastroenterology 118 : 152-162, 2000.

10. Aki Takeuchi, Shuichi Kaneko, Eiki Matsushita, Takeshi Urabe, Atsushi Shimoda, and Kenichi Kobayashi. Interferon-alpha modulates resistance to cisplatin in three human hepatoma cell lines. Journal of Gastroenterology 34: 351-358, 1999
11. Masao Honda, Shuichi Kaneko, Hiroshi Kawai, Yukihiro Shirota, and Kenichi Kobayashi. Differential Gene Expression Between Chronic Hepatitis B and C Hepatic Lesion. Gastroenterology 120: 955-966, 2001.
12. Taro Yamashita, Shuichi Kaneko, Shin-ichi Hashimoto, Taku Sato, Shigenori Nagai, Nobuaki Toyoda, Takuji Suzuki, Kenichi Kobayashi, and Kouji Matsushima. Serial Analysis of Gene Expression in Chronic Hepatitis C and Hepatocellular Carcinoma. Biochemical and Biophysical Research Communications 282: 647-654, 2001.
13. Yukihiro Shirota, Shuichi Kaneko, Masao Honda, Hiroshi F. Kawai, and Kenichi Kobayashi. Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma with cDNA microarrays. Hepatology 33: 832-840, 2001.
14. Hiroshi F. Kawai, Shuichi Kaneko, Masao Honda, Yukihiro Shirota, and Kenichi Kobayashi. Alpha-fetoprotein-producing hepatoma cell lines share common expression profiles of genes in various categories demonstrated by cDNA microarray analysis. Hepatology 33: 676-691, 2001
15. Masaaki Kobayashi, Takashi Mizukoshi, Yasutaka Morita, Yuji Murakami, Kenji Yokoyama, and Eiichi Tamiya. Electrochemical Gene Detection Using Microelectrode Array on a DNA Chip. Electrochemistry 69: 1013-1016, 2001
16. Masaaki Kobayashi, Takashi Mizukami, Yasutake Morita, Yuji Murakami, Kenji Yokoyama, and Eiichi Tamiya. Electrochemical Gene Detection Using Microelectrode Array and PCR. New Technology Japan 29: 11-17, 2001
17. 民谷栄一 村上裕二。 バイオセンサーチップ BME 15: 8-16, 2001

(2)口頭発表

1. 河合博志、金子周一、代田幸博、本多政夫、小林健一。 DNA マイクロアレー法を用いた肝癌細胞株遺伝子発現パターンの包括的解析。 第 36 回日本肝臓総会。 平成 12 年 6 月 8 日
2. Shuichi Kaneko, Kenichi Kobayashi. Gene Expression Hepatocellular Carcinoma. 第 42 回日本消化器病学会大会。 平成 12 年 10 月 26 日
3. Masao Honada, Shuichi Kaneko, Hiroshi Kawai, Yukihiro Shirota, and Kenichi Kobayashi. cDNA Microarray Analysis Reveals Differential Gene Expression between Chronic Hepatitis B

and C Liver Lesions. 第 51 回アメリカ肝臓学会。 平成 12 年 10 月 29 日

4. Yukihiro Shitota, Shuichi Kaneko, Hiroshi F. Kawai, Masao Honda, and Kenichi Kobayashi. Alpha-fetoprotein(AFP) Producing Hepatocellular Carcinoma(HCC) Shares Common Expression Profiles of Genes in Various Categories Demonstrated by cDNA Microarray. 第 51 回アメリカ肝臓学会。 平成 12 年 10 月 29 日

5. 河合博志、金子周一、小林健一。 cDNA Microarray による肝細胞癌・肝硬変・肝癌細胞株の包括的遺伝子発現プロファイリング。 第 87 回日本消化器病学会総会。 平成 13 年 4 月 19 日

6. 河合博志、金子周一、本多政夫、代田幸博、小林健一。 cDNA Microarray による肝細胞癌、肝硬変、肝細胞癌株の包括的遺伝子発現プロファイリング。 第 37 回日本肝臓学会。 平成 13 年 5 月 17 日

7. 代田幸博、本多政夫、河合博志、金子周一、小林健一。 cDNA Microarray を用いた肝細胞癌(HCC) Gene Expression Profile の検討。 第 37 回日本肝臓学会総会。 平成 13 年 5 月 18 日

8. 河合博志、飯田宏、金子周一。 DNA マイクロアレイ情報に基づく肝細胞癌治療薬のストラテジー。 第 43 回日本消化器学会大会。 平成 13 年 10 月 17 日

9. 山下太郎、金子周一、小林健一。 包括的遺伝子発見解析を用いた生体異物代謝の検討。 第 43 回日本消化器病学会。 平成 13 年 10 月 19 日

10. Kazunori Kawaguchi, Shuichi Kaneko, Masao Honda, Hiroshi Kawai, Yukihiro Shirota, and Kenichi Kobayashi. Detection of Hepatitis B Virus DNA in Serum from Patients with Chronic Hepatitis B Using DNA Microarray. 第 52 回アメリカ肝臓学会。 平成 13 年 11 月 11 日

11. Taro Yamashita, Kaneko Shuichi, Masao Honda, Hiroshi Kawai, Kenichi Kobayashi, Shinichi Hashimoto, and Kouji Matsushima. Comprehensive Gene Expression Profile of Hepatocellular Carcinoma Complicated in Viral Hepatitis. 第 52 回アメリカ肝臓学会。

平成 13 年 11 月 11 日

12. Masao Honada, Shuichi Kaneko, Hiroshi Kawai, Yukihiro Shirota, and Kenichi Kobayashi. cDNA Microarray Analysis of Hepatitis Tissue lesions: a molecular portrait of Chronic Hepatitis. 第 52 回アメリカ肝臓学会。 平成 13 年 11 月 11 日

(3)出版物

1. Masaaki Kobayashi, miyuki Oomura, Takashi Kusakawa, Yasutaka Morita, Yuji Murakami, Kenji Yokoyama, and Eiichi Tamiya. Electrochemical Gene Detection with PCR Chip.

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

特許

1. 偏心回転テーブル装置とそれを用いた処理装置

出願番号 特願 2000-326912 (平成 12 年 10 月 26 日)

出願人 (株) 北斗科学産業 民谷栄一 (株) スギノマシン

発明者 村椿良司 民谷栄一 村上裕二

2. 遺伝子の検出方法及び検出用チップ

出願番号 特願 2001-017390 (平成 13 年 1 月 25 日)

出願人 (株) 北斗科学産業 民谷栄一

発明者 民谷栄一

3. スポッティング装置

出願準備中